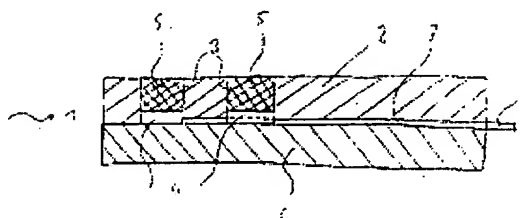


Bio-sensor for amperometric measurements - comprises upper layer contg. apertures contg. electrodes and biological component attached to 2nd layer and conductor

Patent number: DE4013593
Publication date: 1991-10-31
Inventor: BILITEWSKI URSULA DR (DE); RUEGER PETRA (DE)
Applicant: BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH (DE)
Classification:
- international: C07D241/46; C12N11/14; C12Q1/32; G01N27/333;
G01N27/414; G01N27/49; H01L49/00
- european: C12Q1/00B4
Application number: DE19904013593 19900427
Priority number(s): DE19904013593 19900427

Abstract of DE4013593

Process for amperometric measurement uses thick layer biosensors (1) in which the uppermost layer (2) has apertures (3) each contg. partial electrode (4) on one side and the biological component (5) on the other. The upper layer is placed on the second layer (2) which is attached to the partial electrodes and to the conductor (7) to which the electrodes are attached. Both conductor and electrodes contain noble metals. USE/ADVANTAGE - Enables dehydrogenases to be used as the biological component, thus broadening the scope of amperometric measurements previously used with oxidases. There are several apertures so reference electrode and auxilliary electrode(s) can be built in thus combining all the electrodes necessary on one substrate. Another aperture can be filled with electrode material (e.g. a carbon paste) modified with the biological component to form the working electrode.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Best Available Copy



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 40 13 593 A 1

⑤① Int. Cl.⁵:
G 01 N 27/49
G 01 N 27/333
G 01 N 27/414
C 12 Q 1/32
C 12 N 11/14
H 01 L 49/00
C 07 D 241/46

⑳ Aktenzeichen: P 40 13 593.4
㉑ Anmeldetag: 27. 4. 90
㉒ Offenlegungstag: 31. 10. 91

DE 40 13 593 A 1

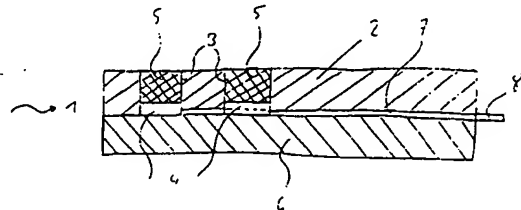
㉑ Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

㉒ Vertreter:
Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉓ Erfinder:
Bilitewski, Ursula, Dr.; Rüger, Petra, 3300
Braunschweig, DE

㉔ Verfahren und Sensor für amperometrische Meßprinzipien mit Dickschicht-Biosensoren

㉕ Mit vorliegender Erfindung wird ein neuartiger Dickschicht-Biosensor vorgestellt, der es gestattet, den Einsatz dieser Sensoren auf die Verwendung von wasserunlöslichen, an Kohle adsorbierten Mediatoren und auf den Einsatz von Dehydrogenasen als biologischer Komponente erweitern. Es werden Beispiele zur Beimischung von Substanzen zur Kohlepasta angegeben, die in die Durchbrüche 3 der obersten Schicht des Dickschicht-Biosensors 1 gepreßt wird.



DE 40 13 593 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und amperometrische Dickschicht-Biosensoren, die den Einsatz dieser Technik auf die Verwendung von wasserunlöslichen, an Kohle adsorbierten Mediatoren und auf den Einsatz von Dehydrogenasen als biologischer Komponente erweitern.

Die Erfindung geht von einem Sensorelement zur Messung von H_2O_2 oder O_2 aus, das als Grundlage von Biosensoren mit Oxidasen als biologischer Komponente angesehen werden kann. Derartige Sensorelemente sind in der US-PS 46 55 880 beschrieben. Sie zeichnen sich durch einen im wesentlichen zweidimensionalen Aufbau aus, bei dem auf ein Substrat Strukturen von 10 bis 20 μm Dicke aufgedruckt werden, die nur aus den leitfähigen Pasten und einer Passivierung bestehen. Die biologische Komponente ist bei derartigen Biosensoren durch ein Gel oder durch Quervernetzen auf der Arbeitselektrode fixiert.

Die Dickschicht-Technik beruht darauf, daß auf einem Substrat (in der Regel Keramik) im Siebdruckverfahren Pasten aufgedruckt und eingebrannt werden. Auf diese Weise lassen sich Hybridschaltungen herstellen, da die Pasten bestimmte elektrische und elektronische Eigenschaften wie Leitfähigkeit und Kapazität besitzen. Wie diese Technik auch für die Herstellung von Biosensoren eingesetzt werden kann, geht im einzelnen aus der allgemeinen Literatur über Dickschicht-Techniken hervor.

Für die Fertigung von Biosensoren sind vor allem die elektrochemischen Sensoren von Interesse. Da es eine Vielzahl von Pasten unterschiedlichster Zusammensetzung und Leitfähigkeit gibt, lassen sich Strukturen drucken, die vom Prinzip her wie konventionelle Edelmetallelektroden (Gold, Platin, Palladium und Legierungen zwischen diesen Metallen) eingesetzt werden können, aber den Vorteil haben, daß sie sehr viel kleiner sind. Diese Technik besitzt daher die Möglichkeit, alle für die Messung benötigten Elektroden wie Arbeitselektrode, Hilfselektrode und eine Referenzelektrode, deren Oberfläche aus Silber besteht, auf einem Substrat aufzubringen.

Neben dieser herkömmlichen Dickschicht-Technik ist in der Literatur auch ein Mehrschichtenverfahren beschrieben, bei dem als Substrat ungebrannte, d. h. flexible Keramik, sogenanntes "green-tape"-Material eingesetzt wird. Dieses Material kann mechanisch bearbeitet werden, d. h. gebohrt und gestanzt werden und besitzt außerdem gute elektrische Isolationseigenschaften. Damit ist es zum Aufbau dreidimensionaler Strukturen bis zu 20 Leiterbahnen geeignet.

Ferner sind in der DE-PS 37 25 597, im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung, potentiometrische Sensoren zur Bestimmung von Ionenaktivitäten, bei denen dieses Substratmaterial zusammen mit den entsprechenden Pasten verwendet wird, beschrieben. Diese Sensoren bestehen aus mehreren Schichten der ungebrannten Keramik, wobei die oberste Schicht Löcher von 0,25 mm Durchmesser enthält, die die ionensensitiven Membranen aufnimmt. Auf diese Weise können mehrere Ionen gleichzeitig bestimmt werden, wobei die Anzahl der zu bestimmenden Ionen von der Zahl der Löcher abhängig ist.

Diesen herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren hatet allerdings der Nachteil an, daß sie nicht in Zusammenhang mit sogenannten Mediatoren angewendet werden können, da die Mediatoren nicht an Edelmetall-

elektroden adsorbiert werden können und damit leicht ausgewaschen werden.

Bei den obenbeschriebenen Dickschicht-Biosensoren können auch nur solche Enzyme eingesetzt werden, bei denen H_2O_2 oder O_2 entsteht bzw. verbraucht wird.

Daher ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren und einen Dickschicht-Biosensor bereitzustellen, der in der Lage ist, den Einsatzbereich von Dickschicht-Biosensoren zu erweitern.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, indem die oberste Schicht des Dickschicht-Biosensors mehrere Durchbrüche aufweist, in die einerseits jeweils eine Teilelektrode und andererseits jeweils eine biologische Komponente eingebracht werden und auf der zweiten Schicht die Teilelektroden und damit verbundene Leiterbahnen in Dickschicht-Technik aufgebracht werden und Edelmetalle enthalten.

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ist Gegenstand der Unteransprüche.

Mit der vorliegenden Erfindung wurden ein Verfahren und Dickschicht-Sensoren entwickelt, die mit den erfindungsgemäßen Merkmalen der unabhängigen Ansprüche wesentliche Vorteile gegenüber den bekannten Bio-Sensorelementen aufweisen. Die Biosensoren werden in einer Mehrschicht-Technik mit der oben erwähnten ungebrannten "grünen" Keramik gefertigt. Ähnlich wie die aus den genannten Druckschriften bekannten Biosensoren für potentiometrische Meßprinzipien enthält die oberste Schicht des erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensors mehrere Durchbrüche, die zur Aufnahme, im Gegensatz zu denen im Stand der Technik genannten Sensoren, des biologischen Materials dienen. Außerdem kommt bei der vorliegenden Erfindung nicht das potentiometrische Meßprinzip, bei dem das elektrische Potential als Indikator für die Endpunkterkennung herangezogen wird, zur Anwendung, sondern das amperometrische Meßprinzip. Mit dem amperometrischen Meßprinzip wird der Stromfluß zwischen zwei Elektroden, an denen eine konstante Spannung liegt, bei der der Polarisationsstrom für das in dem Medium befindliche Metall das Maximum erreicht hat, gemessen. Die gemessene Stromstärke ist ein Maß für die Konzentration des gelösten Stoffes. Die Spannungen liegen im Bereich zwischen 10 mV und 1000 mV und die fließenden Ströme bewegen sich im Mikroampere-Bereich. Die Amperometrie ist im Prinzip ein elektrochemisches Indikationsverfahren zur Erkennung von Titrationspunkten. Die Amperometrie hat gegenüber anderen elektrischen Titrationsmethoden anwendungsspezifische Vorteile, vor allem in der Genauigkeit, wo mit dieser Methode bis zu zwei Größenordnungen genauer gemessen werden kann als beispielsweise mit der potentiometrischen Methode. Auch hat die Amperometrie im Falle der Bestimmung verschiedener Ionen den Vorteil, daß hier keine spezifischen Elektroden verwendet werden müssen. Die meisten Ionen und Molekeln geben polarographische Wellen, so daß es nicht schwer ist, geeignete Reagenzien auszuwählen, die eine amperometrische Indikation ermöglichen. Die Aufnahme einer Strom-Konzentrationskurve wie sie mit vorliegendem erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensor durchgeführt wurde, gibt Aufschluß über die Konzentration des auszumessenden Substrats. Ausgewertet wird der Strom, der zur Rück-Oxidation des entsprechenden Stoffes benötigt wird.

Erfindungsgemäß können die Dickschicht-Biosensoren in ihrer obersten Keramikschicht mehrere Durchbrüche aufweisen, wovon mindestens einer zum Aufbau einer Referenzelektrode und mindestens ein weiterer

als Hilfselektrode verwendet werden kann, so daß alle zur Durchführung der amperometrischen Meßmethode zu benötigenden Elektroden auf einem Substrat vereint sind.

Darin liegt ein wesentlicher Vorteil gegenüber herkömmlichen Sensorelementen gleicher Gattung.

Ein weiterer Vorteil der hier beschriebenen Sensoren gegenüber bisher bekannten Dickschicht-Biosensoren liegt in der Existenz der Durchbrüche auf der Oberfläche des Sensors. Diese Durchbrüche können mit einem weiteren Elektrodenmaterial gefüllt werden, das der Aufnahme der biologischen Komponente der Biosensoren (z. B. Enzym) und/oder von Co-Faktoren (z. B. Nikotinadenindinukleotiden = NAD(P)) und/oder Mediatoren (z. B. Dimethylferrocen, Tetrathiafulvalen) dient. Dadurch kann der Einsatz von Dickschicht-Biosensoren erheblich erweitert werden, da bislang nur solche Enzyme eingesetzt werden konnten, bei denen H_2O_2 oder O_2 entstand bzw. verbraucht wurde. In der vorliegenden Erfindung wurde zusätzlich ein Elektrodenmaterial, z. B. Kohlepaste, eingesetzt, von der bekannt ist, daß sie leicht zu modifizieren ist und die auch in der konventionellen Elektrochemie als Elektrodenmaterial eingesetzt wird. Sie ist ein Gemisch aus einem Öl (z. B. Paraffinöl) und Kohle- bzw. Graphitpulver. Diese Kohlepaste wird in die Vertiefungen der Sensoren gepreßt, die als Arbeitselektroden eingesetzt werden. Die Referenz- und Hilfselektrode bleibt unausgefüllt.

Die Modifikation der Kohlepaste wurde auf verschiedene Arten durchgeführt:

1. Vermischen der Kohlepaste mit Enzym und Co-Faktor.

Auf diese Weise können auch Dehydrogenasen als biologische Komponente der Dickschicht-Biosensoren eingesetzt werden, da ihnen folgendes Reaktionsschema zugrunde liegt:



Der Sensor muß also ständig mit dem Co-Faktor (hier NAD(P)) versorgt werden, während die Konzentration des Substrates bestimmt wird. Ausgewertet wird der Strom, der zur Rück-Oxidation des NAD(P)H zum NAD(P) benötigt wird. Diese Reaktion findet bei den hier beschriebenen Sensoren bei einem Potential von +600 mV gegen Ag/AgCl statt.

2. Zusätzliches Beimischen einer chemischen Verbindung.

Bei +600 mV gegen Ag/AgCl werden eine Reihe von Störungen durch andere elektrochemische aktive Substanzen beobachtet, deren Elektrodenreaktion sich der eigentlichen gewünschten Reaktion überlagert. Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu minimieren, ist die Verwendung chemischer Verbindungen, die das gebildete NADH chemisch oxidieren, selber dabei reduziert werden und bei erheblich niedrigeren Potentialen wieder re-oxidiert werden. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist das im vorliegenden Fall eingesetzte $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ ($\text{NMP} = \text{N-Methylphenazinium}$, $\text{TCNQ} = \text{Tetracyanochinodimethan}$). In der Literatur sind jedoch weitere Verbindungen beschrieben. Das Reaktionsschema sieht dann so aus:



Im Fall des $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ kann das für die Elektrodenreaktion benötigte Potential auf einen Wert zwischen -100 mV und +150 mV reduziert werden. Der dann fließende Strom ist ein Maß für die zu bestimmende Substratkonzentration. Bei der Verwendung der hier beschriebenen Dickschicht-Biosensoren können diese Möglichkeiten ausgenutzt werden, indem die verwendete chemische Verbindung mit der Kohlepaste vermischt wird.

3. Verwendung von Mediatoren zusammen mit Oxidasen

Ähnliche Probleme mit Störsubstanzen wie oben bei den Dehydrogenasen beschrieben, treten auch bei den herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren auf, die Oxidasen als biologische Komponente verwenden, da auch hier häufig Potentiale um +600 mV zur H_2O_2 -Messung angelegt werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß bei einer Reihe von Oxidasen der Sauerstoff durch sogenannte Mediatoren ersetzt werden kann, so daß sich folgendes Reaktionsschema ergibt:



Das für die Elektrodenreaktion benötigte Potential liegt für Mediatoren wie Dimethylferrocen (DMF) oder Tetrathiafulvalen (TTF) bei 220 mV gegen Ag/AgCl. Bei herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren ist der Einsatz der Mediatoren problematisch, da sie an Edelmetallelektroden nicht adsorbiert werden können und damit leicht ausgewaschen werden. An Kohlepaste lassen sie sich dagegen gut adsorbieren. Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde die Kohlepaste auf drei verschiedene Arten mit Mediatoren und Enzymen modifiziert:

- durch Beimischung von Mediator und Oxidase (z. B. Glucoseoxidase)
- durch Beimischung des Mediators und nachträgliches Immobilisieren des Enzyms mit einer der in der Literatur beschriebenen Methode
- durch Adsorption des Mediators durch Auftropfen einer mediatorhaltigen Lösung, Verdampfen des Lösungsmittels, Immobilisieren des Enzyms auf eine der in der Literatur beschriebene Methode.

Die erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensoren, bei denen modifizierte Kohlepaste in Durchbrüche von Dickschicht-Biosensorelementen gepreßt wurde, zeichnen sich also durch folgende Eigenschaften aus:

- Mit Hilfe von "grüner" Keramik lassen sich Sensoren produzieren, die auf dem amperometrischen Meßprinzip beruhen.
- Die Sensoren sind einsetzbar wie die bisher beschriebenen mit konventioneller Dickschicht-Technik gefertigten Biosensoren, d. h., Oxidasen kombiniert mit Wasserstoff-Peroxyd.
- Ohne Probleme können Dehydrogenasen als biologische Komponenten eingesetzt werden
- Mediatoren können auf einfache Weise eingesetzt werden.
- Da die einzelnen Durchbrüche deutlich voneinander getrennt sind, können mehrere verschiedene Enzyme gleichzeitig auf einem Substrat in verschiedenen Durchbrüchen untergebracht werden, so daß die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyte möglich ist. Dabei können auch unterschiedliche

Detektionsprinzipien miteinander kombiniert werden, wie beispielsweise Dehydrogenase, Oxidase mit und ohne Mediator.

Anhand der Zeichnungen werden nun Beispiele der Erfindung und Meßergebnisse näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 einen Längsschnitt, der mit ungebrannter "grüner" Keramik gefertigten Dickschicht-Biosensoren;

Fig. 2 die Draufsicht auf die verwendeten Dickschicht-Biosensoren;

Fig. 3 eine Strom-Konzentrationskurve mit Ethanol als Substrat und Alkohol-Dehydrogenase als biologischer Komponente;

Fig. 4 eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat;

Fig. 5 eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat.

Die Fig. 1 zeigt einen Längsschnitt einer Ausführungsform durch einen erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensor 1, der in Mehrschichttechnik gefertigt wurde. Er besteht im Prinzip aus zwei Schichten 2, 6, die beide aus ungebrannter "grüner" Keramik bestehen. Auf der linken Seite der oberen Schicht 2 sind zwei Durchbrüche 3 von 0,25 mm Durchmesser und 0,3 mm Tiefe zu erkennen, die unten mit einer in Dickschichttechnik gefertigten Teilelektrode 4 ausgefüllt sind und der obere verbleibende Teil des Durchbruchs 3 mit der zu modifizierenden Kohlepaste 5 ausgefüllt ist, so daß die Ränder bündig mit der Oberfläche der obersten Keramikschicht abschließen. Auf die untere Schicht 6 sind ebenfalls in Dickschicht-Technik die Leiterbahnen 7, die mit den Teilelektroden 4 verbunden sind, aufgebracht. Die Teilelektrodenflächen sind entweder mit Platin- oder mit Gold-Dickschichtpaste gedruckt worden. Für den Fall, daß eine Elektrode als Referenzelektrode verwendet werden soll, ist die Teilelektrodenfläche aus Silberpaste zu fertigen, was zu bedeuten hat, daß die elektrisch leitende Paste zusätzlich versilbert und anschließend chloriert werden muß. Auch jedes andere denkbare Material, das als Referenzelektrode geeignet ist, kann hier verwendet werden. Die Leiterbahnen sind aus Kostengründen mit silberhaltiger Paste gedruckt; aber auch Platin- oder Goldpaste kann verwendet werden. Es ist für die Erfindung auch nicht entscheidend, daß die Teilelektrode 4 in den Durchbrüchen 3 aus Goldpaste ist. Die Funktionsweise des Dickschicht-Biosensors bleibt auch erhalten, wenn die Teilelektrode 4 aus unedleren Materialien durch andere Prozesse, z. B. galvanisches Abscheiden, nachträglich mit Edelmetallen wie Gold oder Platin abgedeckt werden.

Fig. 2 zeigt die Draufsicht auf den in Fig. 1 beschriebenen Dickschicht-Biosensor. In diesem Fall besitzt der Dickschicht-Biosensor 4 Durchbrüche 3, die sich alle auf der linken Seite des Sensors befinden. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist die Anzahl der Durchbrüche 3 von der Zahl der zu messenden Ionen abhängig, d. h., je mehr Ionen in einem Medium zu detektieren sind, um so mehr Durchbrüche muß der Dickschicht-Biosensor aufweisen. Die Zahl der Elektroden ist also dem spezifischen Meßproblem anzupassen.

Auch ist die Verteilung der Durchbrüche 3 oder die äußere Form des Dickschicht-Biosensors für die Erfindung nicht von Bedeutung. Wesentlich ist u. a., daß die Durchbrüche 3 in der obersten Schicht 2 des Dickschicht-Biosensors 1 angebracht sind.

In Fig. 3 wird eine Strom-Konzentrationskurve gezeigt, die mit Dickschicht-Biosensoren gemäß der vor-

liegenden Erfindung aufgenommen wurde, wobei das Substrat Ethanol und die biologische Komponente Alkohol-Dehydrogenase war. Auf der Abszisse ist die Konzentration in mM und auf der Ordinate der bei einer konstanten Spannung in mV-Bereich gemessene Strom in nA aufgetragen.

Die Kohlepaste war mit Alkohol-Dehydrogenase (Anteil ca. 5 Gew.-%) und dem Co-Faktor NAD (Anteil: ca. 10 Gew.-%) modifiziert worden. Bei anderen Experimenten wurde die Enzym- und Co-Faktormenge variiert. Der Co-Faktor im Bereich zwischen 1 bis 12 Gew.-% und das im Enzym im Bereich von 2 bis 5 Gew.-% Die Co-Faktormenge beeinflusst die Empfindlichkeit des Sensors, d. h., je mehr Co-Faktor desto größer die Ströme bei gleicher Substratkonzentration. Die Enzymmenge beeinflusst die Stabilität, d. h. je mehr Enzym desto länger ist der Zeitraum, über den der Sensor benutzt werden kann.

Die Fig. 4 zeigt eine ähnliche Kurve wie die in Fig. 3, nur ist hier das Substrat Glucose und das Enzym Glucose-Dehydrogenase. Die Kohlepaste war mit Glucose-Dehydrogenase von ca. 5 Gew.-% als Enzym und NAD von ca. 10 Gew.-% als Co-Faktor modifiziert worden.

In Fig. 5 wird eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat gezeigt. Auf der Abszisse ist die Glucose in mMol/l aufgetragen und auf der Ordinate ist der gemessene Strom in μ A aufgetragen. Die Kohlepaste war mit TTF als Mediator und Glucose als Substrat und Glucoseoxidase immobilisiert über eine Schiffsbasis bei einem Potential von +220 mV. Das Enzym Glucoseoxidase wurde kovalent an der Elektrode gebunden.

Die Meßergebnisse der gezeigten Kurven zeigen die ausgezeichnete Arbeitsweise der erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensoren, die in Zusammenhang mit der amperometrischen Meßmethode eine befriedigende Meßgenauigkeit ergeben.

Patentansprüche

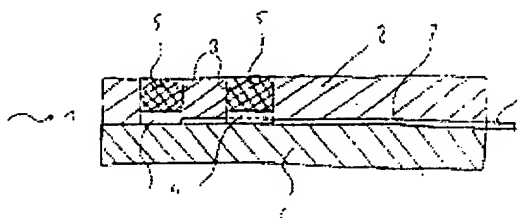
1. Verfahren für amperometrische Meßprinzipien mit Dickschicht-Biosensoren (1), bei denen die oberste Schicht (2) Durchbrüche (3) aufweist, in die einerseits jeweils eine Teilelektrode (4) und andererseits jeweils eine biologische Komponente (5) eingebracht wird und auf der zweiten Schicht (6) die Teilelektroden und die damit verbundenen Leiterbahnen (7) in Dickschicht-Technik aufgebracht werden und Edelmetalle enthalten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die biologische Komponente (5) eine modifizierte Kohlepaste verwendet wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlepaste ein Gemisch aus einem geeigneten Öl (z. B. Paraffinöl) und Graphitpulver ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die mit der Kohlepaste aufgefüllten Durchbrüche (3) als Arbeitselektrode verwendet werden.
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils eine der Teilelektroden (4) als Referenz- und Hilfselektrode verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die als Referenz- und Hilfselektrode verwendeten Durchbrüche (3) nicht mit einer biologischen Komponente aufgefüllt werden.

Bio-sensor for amperometric measurements - comprises upper layer contg. apertures contg. electrodes and biological component attached to 2nd layer and conductor

Patent number: DE4013593
Publication date: 1991-10-31
Inventor: BILITEWSKI URSULA DR (DE); RUEGER PETRA (DE)
Applicant: BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH (DE)
Classification:
- International: C07D241/46; C12N11/14; C12Q1/32; G01N27/333;
G01N27/414; G01N27/49; H01L49/00
- european: C12Q1/00B4
Application number: DE19904013593 19900427
Priority number(s): DE19904013593 19900427

Abstract of DE4013593

Process for amperometric measurement uses thick layer biosensors (1) in which the uppermost layer (2) has apertures (3) each contg. partial electrode (4) on one side and the biological component (5) on the other. The upper layer is placed on the second layer (2) which is attached to the partial electrodes and to the conductor (7) to which the electrodes are attached. Both conductor and electrodes contain noble metals. USE/ADVANTAGE - Enables dehydrogenases to be used as the biological component, thus broadening the scope of amperometric measurements previously used with oxidases. There are several apertures so reference electrode and auxilliary electrode(s) can be built in thus combining all the electrodes necessary on one substrate. Another aperture can be filled with electrode material (e.g. a carbon paste) modified with the biological component to form the working electrode.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 13 593 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 13 593.4
㉑ Anmeldetag: 27. 4. 90
㉒ Offenlegungstag: 31. 10. 91

㉓ Int. Cl.⁵:
G 01 N 27/49
G 01 N 27/333
G 01 N 27/414
C 12 Q 1/32
C 12 N 11/14
H 01 L 49/00
C 07 D 241/46

DE 40 13 593 A 1

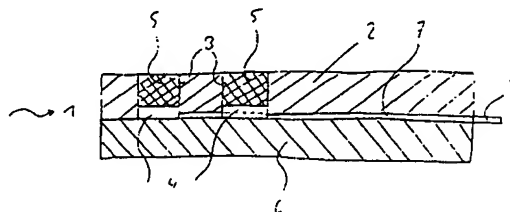
㉔ Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

㉕ Vertreter:
Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉖ Erfinder:
Bilitewski, Ursula, Dr.; Rüger, Petra, 3300
Braunschweig, DE

㉗ Verfahren und Sensor für amperometrische Meßprinzipien mit Dickschicht-Biosensoren

㉘ Mit vorliegender Erfindung wird ein neuartiger Dickschicht-Biosensor vorgestellt, der es gestattet, den Einsatz dieser Sensoren auf die Verwendung von wasserunlöslichen, an Kohle adsorbierten Mediatoren und auf den Einsatz von Dehydrogenasen als biologischer Komponente erweitern. Es werden Beispiele zur Beimischung von Substanzen zur Kohlepaste angegeben, die in die Durchbrüche 3 der obersten Schicht des Dickschicht-Biosensors 1 gepreßt wird.



DE 40 13 593 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und amperometrische Dickschicht-Biosensoren, die den Einsatz dieser Technik auf die Verwendung von wasserunlöslichen, an Kohle adsorbierten Mediatoren und auf den Einsatz von Dehydrogenasen als biologischer Komponente erweitern.

Die Erfindung geht von einem Sensorelement zur Messung von H_2O_2 oder O_2 aus, das als Grundlage von Biosensoren mit Oxidasen als biologischer Komponente angesehen werden kann. Derartige Sensorelemente sind in der US-PS 46 55 880 beschrieben. Sie zeichnen sich durch einen im wesentlichen zweidimensionalen Aufbau aus, bei dem auf ein Substrat Strukturen von 10 bis 20 μm Dicke aufgedruckt werden, die nur aus den leitfähigen Pasten und einer Passivierung bestehen. Die biologische Komponente ist bei derartigen Biosensoren durch ein Gel oder durch Quervernetzen auf der Arbeitselektrode fixiert.

Die Dickschicht-Technik beruht darauf, daß auf einem Substrat (in der Regel Keramik) im Siebdruckverfahren Pasten aufgedruckt und eingebrannt werden. Auf diese Weise lassen sich Hybridschaltungen herstellen, da die Pasten bestimmte elektrische und elektronische Eigenschaften wie Leitfähigkeit und Kapazität besitzen. Wie diese Technik auch für die Herstellung von Biosensoren eingesetzt werden kann, geht im einzelnen aus der allgemeinen Literatur über Dickschicht-Techniken hervor.

Für die Fertigung von Biosensoren sind vor allem die elektrochemischen Sensoren von Interesse. Da es eine Vielzahl von Pasten unterschiedlichster Zusammensetzung und Leitfähigkeit gibt, lassen sich Strukturen drucken, die vom Prinzip her wie konventionelle Edelmetallelektroden (Gold, Platin, Palladium und Legierungen zwischen diesen Metallen) eingesetzt werden können, aber den Vorteil haben, daß sie sehr viel kleiner sind. Diese Technik besitzt daher die Möglichkeit, alle für die Messung benötigten Elektroden wie Arbeitselektrode, Hilfelektrode und eine Referenzelektrode, deren Oberfläche aus Silber besteht, auf einem Substrat aufzubringen.

Neben dieser herkömmlichen Dickschicht-Technik ist in der Literatur auch ein Mehrschichtenverfahren beschrieben, bei dem als Substrat ungebrannte, d. h. flexible Keramik, sogenanntes "green-tape"-Material eingesetzt wird. Dieses Material kann mechanisch bearbeitet werden, d. h. gebohrt und gestanzt werden und besitzt außerdem gute elektrische Isolationseigenschaften. Damit ist es zum Aufbau dreidimensionaler Strukturen bis zu 20 Leiterbahnen geeignet.

Ferner sind in der DE-PS 37 25 597, im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung, potentiometrische Sensoren zur Bestimmung von Ionenaktivitäten, bei denen dieses Substratmaterial zusammen mit den entsprechenden Pasten verwendet wird, beschrieben. Diese Sensoren bestehen aus mehreren Schichten der ungebrannten Keramik, wobei die oberste Schicht Löcher von 0,25 mm Durchmesser enthält, die die ionensensitiven Membranen aufnimmt. Auf diese Weise können mehrere Ionen gleichzeitig bestimmt werden, wobei die Anzahl der zu bestimmenden Ionen von der Zahl der Löcher abhängig ist.

Diesen herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren hatet allerdings der Nachteil an, daß sie nicht in Zusammenhang mit sogenannten Mediatoren angewendet werden können, da die Mediatoren nicht an Edelmetall-

elektroden adsorbiert werden können und damit leicht ausgewaschen werden.

Bei den obenbeschriebenen Dickschicht-Biosensoren können auch nur solche Enzyme eingesetzt werden, bei denen H_2O_2 oder O_2 entsteht bzw. verbraucht wird.

Daher ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren und einen Dickschicht-Biosensor bereitzustellen, der in der Lage ist, den Einsatzbereich von Dickschicht-Biosensoren zu erweitern.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, indem die oberste Schicht des Dickschicht-Biosensors mehrere Durchbrüche aufweist, in die einerseits jeweils eine Teilelektrode und andererseits jeweils eine biologische Komponente eingebracht werden und auf der zweiten Schicht die Teilelektroden und damit verbundene Leiterbahnen in Dickschicht-Technik aufgebracht werden und Edelmetalle enthalten.

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ist Gegenstand der Unteransprüche.

Mit der vorliegenden Erfindung wurden ein Verfahren und Dickschicht-Sensoren entwickelt, die mit den erfindungsgemäßen Merkmalen der unabhängigen Ansprüche wesentliche Vorteile gegenüber den bekannten Bio-Sensorelementen aufweisen. Die Biosensoren werden in einer Mehrschicht-Technik mit der oben erwähnten ungebrannten "grünen" Keramik gefertigt. Ähnlich wie die aus den genannten Druckschriften bekannten Biosensoren für potentiometrische Meßprinzipien enthält die oberste Schicht des erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensors mehrere Durchbrüche, die zur Aufnahme, im Gegensatz zu denen im Stand der Technik genannten Sensoren, des biologischen Materials dienen. Außerdem kommt bei der vorliegenden Erfindung nicht das potentiometrische Meßprinzip, bei dem das elektrische Potential als Indikator für die Endpunkterkennung herangezogen wird, zur Anwendung, sondern das amperometrische Meßprinzip. Mit dem amperometrischen Meßprinzip wird der Stromfluß zwischen zwei Elektroden, an denen eine konstante Spannung liegt, bei der der Polarisationsstrom für das in dem Medium befindliche Metall das Maximum erreicht hat, gemessen. Die gemessene Stromstärke ist ein Maß für die Konzentration des gelösten Stoffes. Die Spannungen liegen im Bereich zwischen 10 mV und 1000 mV und die fließenden Ströme bewegen sich im Mikroampere-Bereich. Die Amperometrie ist im Prinzip ein elektrochemisches Indikationsverfahren zur Erkennung von Titrationspunkten. Die Amperometrie hat gegenüber anderen elektrischen Titrationsmethoden anwendungsspezifische Vorteile, vor allem in der Genauigkeit, wo mit dieser Methode bis zu zwei Größenordnungen genauer gemessen werden kann als beispielweise mit der potentiometrischen Methode. Auch hat die Amperometrie im Falle der Bestimmung verschiedener Ionen den Vorteil, daß hier keine spezifischen Elektroden verwendet werden müssen. Die meisten Ionen und Molekeln geben polarographische Wellen, so daß es nicht schwer ist, geeignete Reagenzien auszuwählen, die eine amperometrische Indikation ermöglichen. Die Aufnahme einer Strom-Konzentrationskurve wie sie mit vorliegendem erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensor durchgeführt wurde, gibt Aufschluß über die Konzentration des auszumessenden Substrats. Ausgewertet wird der Strom, der zur Rück-Oxidation des entsprechenden Stoffes benötigt wird.

Erfindungsgemäß können die Dickschicht-Biosensoren in ihrer obersten Keramikschicht mehrere Durchbrüche aufweisen, wovon mindestens einer zum Aufbau einer Referenzelektrode und mindestens ein weiterer

als Hilfselektrode verwendet werden kann, so daß alle zur Durchführung der amperometrischen Meßmethode zu benötigten Elektroden auf einem Substrat vereint sind.

Darin liegt ein wesentlicher Vorteil gegenüber herkömmlichen Sensorelementen gleicher Gattung.

Ein weiterer Vorteil der hier beschriebenen Sensoren gegenüber bisher bekannten Dickschicht-Biosensoren liegt in der Existenz der Durchbrüche auf der Oberfläche des Sensors. Diese Durchbrüche können mit einem weiteren Elektrodenmaterial gefüllt werden, das der Aufnahme der biologischen Komponente der Biosensoren (z. B. Enzym) und/oder von Co-Faktoren (z. B. Nikotinadenin dinukleotiden = NAD(P)) und/oder Mediatoren (z. B. Dimethylferrocen, Tetrathiafulvalen) dient. Dadurch kann der Einsatz von Dickschicht-Biosensoren erheblich erweitert werden, da bislang nur solche Enzyme eingesetzt werden konnten, bei denen H_2O_2 oder O_2 entstand bzw. verbraucht wurde. In der vorliegenden Erfindung wurde zusätzlich ein Elektrodenmaterial, z. B. Kohlepaste, eingesetzt, von der bekannt ist, daß sie leicht zu modifizieren ist und die auch in der konventionellen Elektrochemie als Elektrodenmaterial eingesetzt wird. Sie ist ein Gemisch aus einem Öl (z. B. Paraffinöl) und Kohle- bzw. Graphitpulver. Diese Kohlepaste wird in die Vertiefungen der Sensoren gepreßt, die als Arbeitselektroden eingesetzt werden. Die Referenz- und Hilfselektrode bleibt unausgefüllt.

Die Modifikation der Kohlepaste wurde auf verschiedene Arten durchgeführt:

1. Vermischen der Kohlepaste mit Enzym und Co-Faktor.

Auf diese Weise können auch Dehydrogenasen als biologische Komponente der Dickschicht-Biosensoren eingesetzt werden, da ihnen folgendes Reaktionsschema zugrunde liegt:



Der Sensor muß also ständig mit dem Co-Faktor (hier NAD(P)) versorgt werden, während die Konzentration des Substrates bestimmt wird. Ausgewertet wird der Strom, der zur Rück-Oxidation des NAD(P)H zum NAD(P) benötigt wird. Diese Reaktion findet bei den hier beschriebenen Sensoren bei einem Potential von +600 mV gegen Ag/AgCl statt.

2. Zusätzliches Beimischen einer chemischen Verbindung.

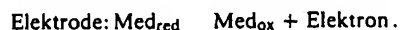
Bei +600 mV gegen Ag/AgCl werden eine Reihe von Störungen durch andere elektrochemische aktive Substanzen beobachtet, deren Elektrodenreaktion sich der eigentlichen gewünschten Reaktion überlagert. Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu minimieren, ist die Verwendung chemischer Verbindungen, die das gebildete NADH chemisch oxidieren, selber dabei reduziert werden und bei erheblich niedrigeren Potentialen wieder re-oxidiert werden. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist das im vorliegenden Fall eingesetzte $\text{NMP}^+ \text{TCNQ}^-$ ($\text{NMP} = \text{N-Methylphenazinium}$, $\text{TCNQ} = \text{Tetracyanochinodimethan}$). In der Literatur sind jedoch weitere Verbindungen beschrieben. Das Reaktionsschema sieht dann so aus:



Im Fall des $\text{NMP}^+ \text{TCNQ}^-$ kann das für die Elektrodenreaktion benötigte Potential auf einen Wert zwischen -100 mV und +150 mV reduziert werden. Der dann fließende Strom ist ein Maß für die zu bestimmende Substratkonzentration. Bei der Verwendung der hier beschriebenen Dickschicht-Biosensoren können diese Möglichkeiten ausgenutzt werden, indem die verwendete chemische Verbindung mit der Kohlepaste vermischt wird.

3. Verwendung von Mediatoren zusammen mit Oxidasen

Ähnliche Probleme mit Störsubstanzen wie oben bei den Dehydrogenasen beschrieben, treten auch bei den herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren auf, die Oxidasen als biologische Komponente verwenden, da auch hier häufig Potentiale um +600 mV zur H_2O_2 -Messung angelegt werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß bei einer Reihe von Oxidasen der Sauerstoff durch sogenannte Mediatoren ersetzt werden kann, so daß sich folgendes Reaktionsschema ergibt:



Das für die Elektrodenreaktion benötigte Potential liegt für Mediatoren wie Dimethylferrocen (DMF) oder Tetrathiafulvalen (TTF) bei 220 mV gegen Ag/AgCl. Bei herkömmlichen Dickschicht-Biosensoren ist der Einsatz der Mediatoren problematisch, da sie an Edelmetallelektroden nicht adsorbiert werden können und damit leicht ausgewaschen werden. An Kohlepaste lassen sie sich dagegen gut adsorbieren. Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde die Kohlepaste auf drei verschiedene Arten mit Mediatoren und Enzymen modifiziert:

a) durch Beimischung von Mediator und Oxidase (z. B. Glucoseoxidase)

b) durch Beimischung des Mediators und nachträgliches Immobilisieren des Enzyms mit einer der in der Literatur beschriebenen Methode

c) durch Adsorption des Mediators durch Auftropfen einer mediatorhaltigen Lösung, Verdampfen des Lösungsmittels, Immobilisieren des Enzyms auf eine der in der Literatur beschriebene Methode.

Die erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensoren, bei denen modifizierte Kohlepaste in Durchbrüche von Dickschicht-Biosensorelementen gepreßt wurde, zeichnen sich also durch folgende Eigenschaften aus:

a) Mit Hilfe von "grüner" Keramik lassen sich Sensoren produzieren, die auf dem amperometrischen Meßprinzip beruhen.

b) Die Sensoren sind einsetzbar wie die bisher beschriebenen mit konventioneller Dickschicht-Technik gefertigten Biosensoren, d. h., Oxidasen kombiniert mit Wasserstoff-Peroxyd.

c) Ohne Probleme können Dehydrogenasen als biologische Komponenten eingesetzt werden

d) Mediatoren können auf einfache Weise eingesetzt werden.

e) Da die einzelnen Durchbrüche deutlich voneinander getrennt sind, können mehrere verschiedene Enzyme gleichzeitig auf einem Substrat in verschiedenen Durchbrüchen untergebracht werden, so daß die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyte möglich ist. Dabei können auch unterschiedliche

Detektionsprinzipien miteinander kombiniert werden, wie beispielsweise Dehydrogenase, Oxidase mit und ohne Mediator.

Anhand der Zeichnungen werden nun Beispiele der Erfindung und Meßergebnisse näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 einen Längsschnitt, der mit ungebrannter "grüner" Keramik gefertigten Dickschicht-Biosensoren;

Fig. 2 die Draufsicht auf die verwendeten Dickschicht-Biosensoren;

Fig. 3 eine Strom-Konzentrationskurve mit Ethanol als Substrat und Alkohol-Dehydrogenase als biologischer Komponente;

Fig. 4 eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat;

Fig. 5 eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat.

Die Fig. 1 zeigt einen Längsschnitt einer Ausführungsform durch einen erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensor 1, der in Mehrschichttechnik gefertigt wurde. Er besteht im Prinzip aus zwei Schichten 2, 6, die beide aus ungebrannter "grüner" Keramik bestehen. Auf der linken Seite der oberen Schicht 2 sind zwei Durchbrüche 3 von 0,25 mm Durchmesser und 0,3 mm Tiefe zu erkennen, die unten mit einer in Dickschichttechnik gefertigten Teilelektrode 4 ausgefüllt sind und der obere verbleibende Teil des Durchbruchs 3 mit der zu modifizierenden Kohlepaste 5 ausgefüllt ist, so daß die Ränder bündig mit der Oberfläche der obersten Keramikschicht abschließen. Auf die untere Schicht 6 sind ebenfalls in Dickschicht-Technik die Leiterbahnen 7, die mit den Teilelektroden 4 verbunden sind, aufgebracht. Die Teilelektrodenflächen sind entweder mit Platin- oder mit Gold-Dickschichtpaste gedruckt worden. Für den Fall, daß eine Elektrode als Referenzelektrode verwendet werden soll, ist die Teilelektrodenfläche aus Silberpaste zu fertigen, was zu bedeuten hat, daß die elektrisch leitende Paste zusätzlich versilbert und anschließend chloriert werden muß. Auch jedes andere denkbare Material, das als Referenzelektrode geeignet ist, kann hier verwendet werden. Die Leiterbahnen sind aus Kostengründen mit silberhaltiger Paste gedruckt; aber auch Platin- oder Goldpaste kann verwendet werden. Es ist für die Erfindung auch nicht entscheidend, daß die Teilelektrode 4 in den Durchbrüchen 3 aus Goldpaste ist. Die Funktionsweise des Dickschicht-Biosensors bleibt auch erhalten, wenn die Teilelektrode 4 aus unedleren Materialien durch andere Prozesse, z. B. galvanisches Abscheiden, nachträglich mit Edelmetallen wie Gold oder Platin abgedeckt werden.

Fig. 2 zeigt die Draufsicht auf den in Fig. 1 beschriebenen Dickschicht-Biosensor. In diesem Fall besitzt der Dickschicht-Biosensor 4 Durchbrüche 3, die sich alle auf der linken Seite des Sensors befinden. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist die Anzahl der Durchbrüche 3 von der Zahl der zu messenden Ionen abhängig, d. h., je mehr Ionen in einem Medium zu detektieren sind, um so mehr Durchbrüche muß der Dickschicht-Biosensor aufweisen. Die Zahl der Elektroden ist also dem spezifischen Meßproblem anzupassen.

Auch ist die Verteilung der Durchbrüche 3 oder die äußere Form des Dickschicht-Biosensors für die Erfindung nicht von Bedeutung. Wesentlich ist u. a., daß die Durchbrüche 3 in der obersten Schicht 2 des Dickschicht-Biosensors 1 angebracht sind.

In Fig. 3 wird eine Strom-Konzentrationskurve gezeigt, die mit Dickschicht-Biosensoren gemäß der vor-

liegenden Erfindung aufgenommen wurde, wobei das Substrat Ethanol und die biologische Komponente Alkohol-Dehydrogenase war. Auf der Abszisse ist die Konzentration in mM und auf der Ordinate der bei einer konstanten Spannung in mV-Bereich gemessene Strom in nA aufgetragen.

Die Kohlepaste war mit Alkohol-Dehydrogenase (Anteil ca. 5 Gew.-%) und dem Co-Faktor NAD (Anteil: ca. 10 Gew.-%) modifiziert worden. Bei anderen Experimenten wurde die Enzym- und Co-Faktormenge variiert. Der Co-Faktor im Bereich zwischen 1 bis 12 Gew.-% und das im Enzym im Bereich von 2 bis 5 Gew.-% Die Co-Faktormenge beeinflusst die Empfindlichkeit des Sensors, d. h., je mehr Co-Faktor desto größer die Ströme bei gleicher Substratkonzentration. Die Enzymmenge beeinflusst die Stabilität, d. h. je mehr Enzym desto länger ist der Zeitraum, über den der Sensor benutzt werden kann.

Die Fig. 4 zeigt eine ähnliche Kurve wie die in Fig. 3, nur ist hier das Substrat Glucose und das Enzym Glucose-Dehydrogenase. Die Kohlepaste war mit Glucose-Dehydrogenase von ca. 5 Gew.-% als Enzym und NAD von ca. 10 Gew.-% als Co-Faktor modifiziert worden.

In Fig. 5 wird eine Strom-Konzentrationskurve mit Glucose als Substrat gezeigt. Auf der Abszisse ist die Glucose in mMol/l aufgetragen und auf der Ordinate ist der gemessene Strom in μ A aufgetragen. Die Kohlepaste war mit TTF als Mediator und Glucose als Substrat und Glucoseoxidase immobilisiert über eine Schiffsbasis bei einem Potential von +220 mV. Das Enzym Glucoseoxidase wurde kovalent an der Elektrode gebunden.

Die Meßergebnisse der gezeigten Kurven zeigen die ausgezeichnete Arbeitsweise der erfindungsgemäßen Dickschicht-Biosensoren, die in Zusammenhang mit der amperometrischen Meßmethode eine befriedigende Meßgenauigkeit ergeben.

Patentansprüche

1. Verfahren für amperometrische Meßprinzipien mit Dickschicht-Biosensoren (1), bei denen die oberste Schicht (2) Durchbrüche (3) aufweist, in die einerseits jeweils eine Teilelektrode (4) und andererseits jeweils eine biologische Komponente (5) eingebracht wird und auf der zweiten Schicht (6) die Teilelektroden und die damit verbundenen Leiterbahnen (7) in Dickschicht-Technik aufgebracht werden und Edelmetalle enthalten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die biologische Komponente (5) eine modifizierte Kohlepaste verwendet wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlepaste ein Gemisch aus einem geeigneten Öl (z. B. Paraffinöl) und Graphitpulver ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die mit der Kohlepaste aufgefüllten Durchbrüche (3) als Arbeitselektrode verwendet werden.
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils eine der Teilelektroden (4) als Referenz- und Hilfselektrode verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die als Referenz- und Hilfselektrode verwendeten Durchbrüche (3) nicht mit einer biologischen Komponente aufgefüllt werden.

7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlepaste mit Enzymen und/oder Co-Faktoren und/oder Mediatoren vermischt wird.

8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als biologische Komponente (5) Dehydrogenasen verwendet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Modifikation der Paste chemische Verbindungen verwendet werden, die das gebildete NADH chemisch oxidieren, selber dabei reduziert werden und bei erheblich niedrigerem Potential wieder re-oxidiert werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die chemische Verbindung beispielsweise $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ (NMP = N-Methylphenazinium, TCNQ = Tetracyanochinodimethan) ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlepaste mit einem Mediator und Oxidase (z. B. Glucoseoxidase) modifiziert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kohlepaste mit einem Mediator vermischt wird und nachträglich das Enzym mit einer bekannten Methode immobilisiert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine mediatorhaltige Lösung aufgetropft, das Lösungsmittel verdunstet und das Enzym mit einer bekannten Methode immobilisiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß unterschiedliche Detektionsprinzipien miteinander kombiniert werden, z. B. Dehydrogenase, Oxidase mit und ohne Mediator.

15. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor zur Durchführung des nach Anspruch 1 beschriebenen Verfahrens, bestehend aus mehreren Schichten eines geeigneten Keramikmaterials (2, 6) (z. B. "grüne" Keramik), wobei die oberste Schicht mehrere Durchbrüche (3) aufweist, die jeweils eine Teilelektrode (4) aufnehmen und die über den Teilelektrodenflächen befindlichen Vertiefungen mit einer zur amperometrischen Messung geeigneten Paste (5) aufgefüllt sind und einer zweiten Schicht (6), auf die in Dickschicht-Technik aufgetragene Teilelektroden (4) und die damit verbundenen Leiterbahnen (7) gedrückt sind und beide Edelmetalle enthalten.

16. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor, dadurch gekennzeichnet, daß sich alle für amperometrische Messungen benötigten Elektroden auf einem Substrat befinden.

17. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor nach Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 4 Elektroden auf einem Substrat angeordnet sind.

18. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß in die über den Teilelektroden (4) befindlichen Durchbrüchen (3) gleichzeitig auf einem Substrat verschiedene Enzyme eingebracht sind.

19. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Biosensor in Dickschicht-Technik gefertigt ist.

20. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierte Kohlepaste (5) in die über den Elektroden befindlichen Vertiefungen eingepreßt ist.

21. Amperometrischer Dickschicht-Biosensor nach einem der vorangegangenen Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode zusätzlich zunächst versilbert und anschließend chloriert wird.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

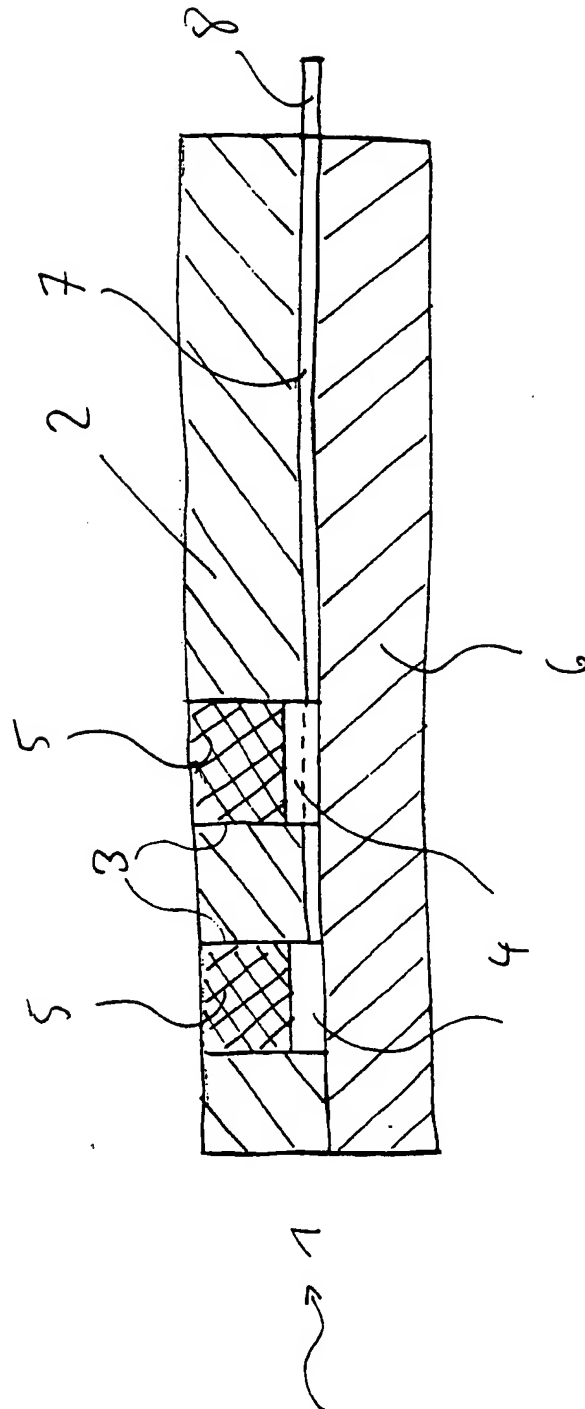


Fig. 1

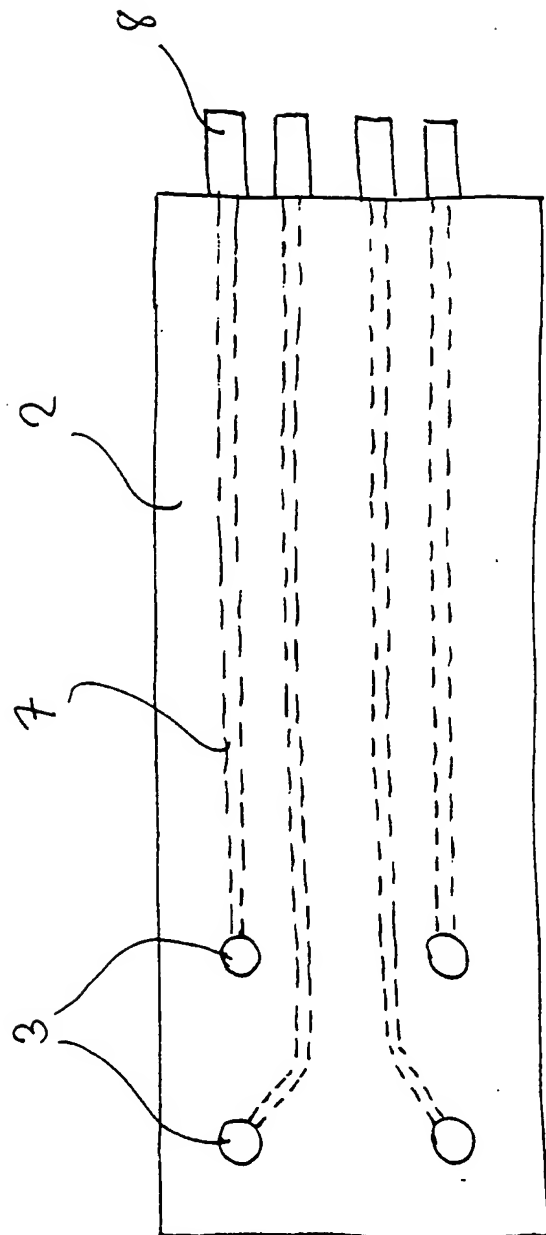


Fig. 2

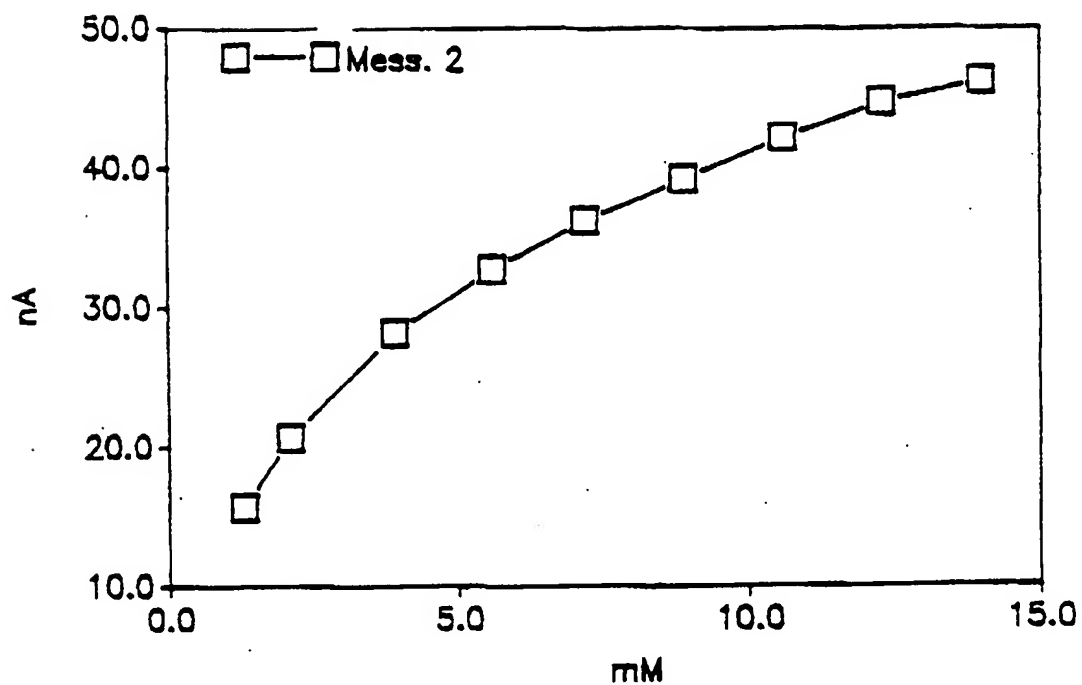


Fig. 3

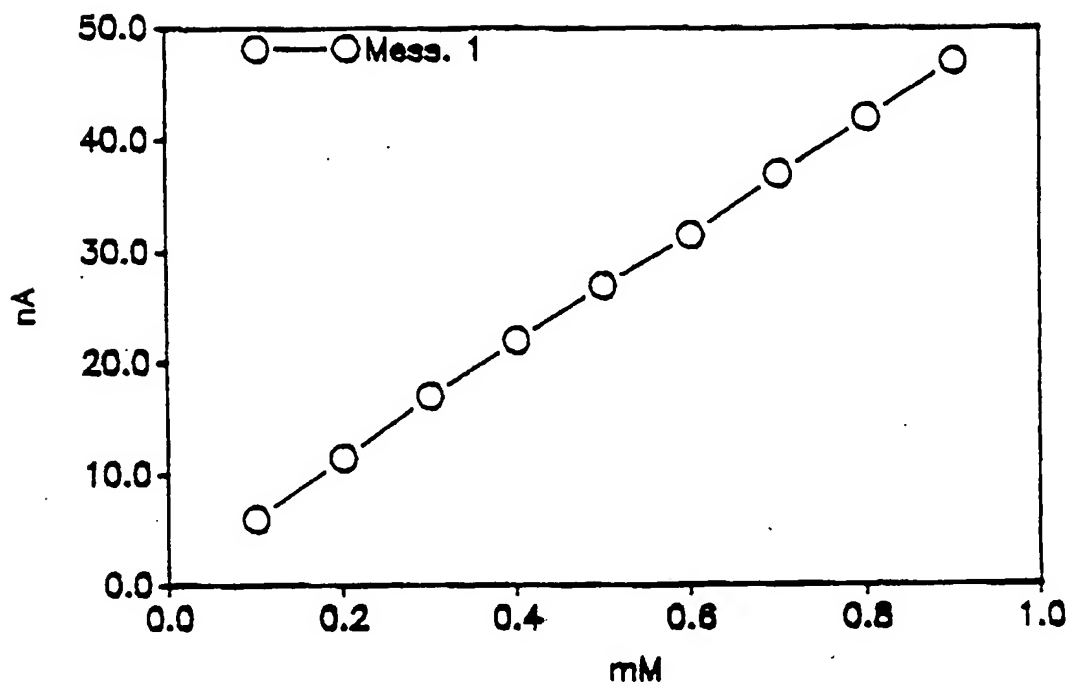


Fig. 4

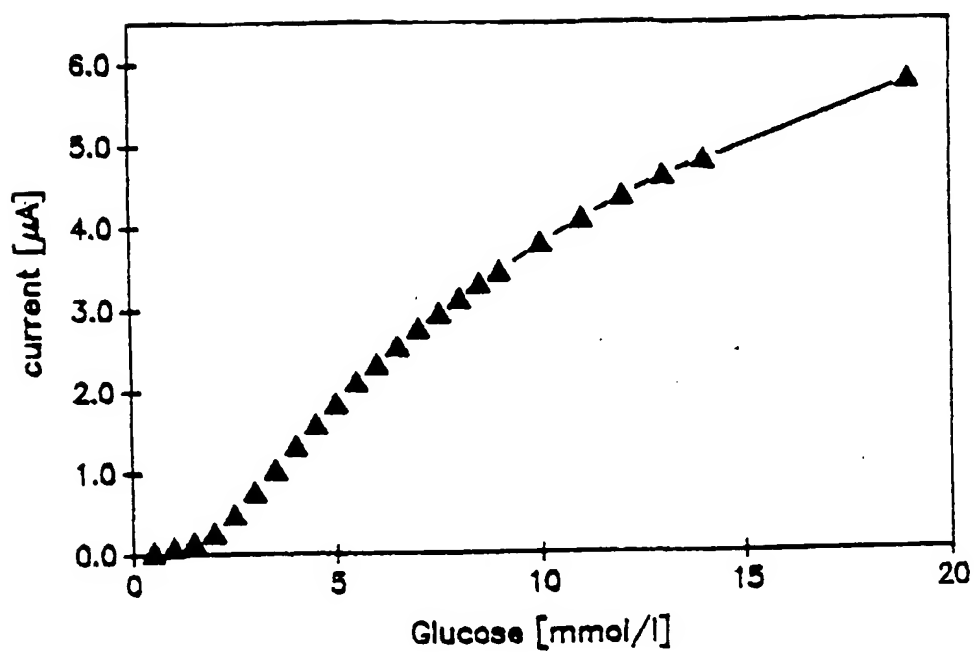


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.